

郑舒文,洪晓松,王 昊. 沙地云杉、沙冬青和山杏 ISSR-PCR 反应体系优化及种间多态性比较[J]. 江苏农业科学,2018,46(2):27-29.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.02.007

沙地云杉、沙冬青和山杏 ISSR-PCR 反应体系优化及种间多态性比较

郑舒文,洪晓松,王 昊

(辽宁省盐碱地利用研究所,辽宁盘锦 124000)

摘要:利用 ISSR 分子标记技术对沙冬青、沙地云杉、克旗山杏和凉城山杏的 PCR 反应体系进行了优化,分别建立了适合沙地云杉、沙冬青、克旗山杏和凉城山杏的 ISSR 标记扩增体系;利用筛选出的 11 个扩增条带清晰且多态性高的引物对沙地云杉、沙冬青、克旗山杏和凉城山杏进行遗传多样性研究。其中得到清晰谱带 187 条,多态性谱带 184 条,多态位点百分率(PPB)为 98.40%。应用 POPGENE32 分析表明:观察等位基因数(N_a)为 1.984 0,有效等位基因数(N_e)为 1.678 1,Nei's 基因多样性(H_e)为 0.396 4,Shannon 多态性信息指数(I')为 0.582 0。采用 UPGAM 法聚类分析表明:沙地云杉、沙冬青、克旗山杏和凉城山杏可分为 3 类,克旗山杏和凉城山杏为 I 类,沙地云杉为 II 类,沙冬青为 III 类。聚类分析结果显示,除了山杏物种之间的亲缘性之外,沙冬青与山杏的亲缘关系较远,相似性较低;沙地云杉与山杏 2 个不同物种却有一定的相似性。

关键词:沙地云杉;沙冬青;山杏;ISSR;体系优化;遗传多样性

中图分类号:S722.3⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)02-0027-03

沙冬青、山杏和沙地云杉都是内蒙古地区的特有植物。沙冬青 [*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.] 属于豆科蝶形花亚科沙冬青属,是古老的残遗濒危物种,为常绿灌木,主要分布在我国西北地区,是中国北方干旱半荒漠地区唯一的旱生常绿阔叶灌木^[1-2],具有水土保持、固沙、观赏和药用价值^[3]。沙地云杉 (*Picea mongolica*) 是中国稀有珍贵树种,集中成片分布在生态环境恶劣的内蒙古自治区以克什克腾旗的白音敖包自然保护区,具有耐旱抗寒、防风阻沙、调节气候等特点^[4]。山杏 (*Siberian Apricot*) 又名西伯利亚杏,为蔷薇科杏属植物,主要分布在俄罗斯的西伯利亚、蒙古的东部和东南部以及我国北纬 40° 地区,抗低温能力强,根系发达,抗旱、耐瘠薄、耐盐碱,不耐涝。

内蒙古属典型的中温带季风气候,具有降水量少而不匀、

寒暑变化剧烈的显著特点^[5]。这些生存并且繁衍的植物为了适应恶劣的环境,生理性状发生改变的同时遗传因子肯定也会发生一系列的变化。因此本研究通过 4 种特有物种的遗传多样性的分析,为种间杂交育种提供理论基础,实现内蒙古特有植物的繁衍,进而为美化内蒙古的环境作出贡献。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

摘取沙冬青、山杏、沙地云杉的种子,分装放在布袋里,放在 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取各自的种子,去掉种皮,利用 CTAB 法提取基因组 DNA。采用琼脂糖凝胶电泳的方法检测纯度和浓度,UVP 型凝胶成像分析系统拍照记录,最后分别装入 1.5 mL 离心管并保存在 -20℃ 的条件下。

1.2.2 PCR 扩增 ISSR-PCR 反应体系经过优化确定为 20 μL,其中引物 1 μL、*Taq* Mix 10 μL、水 8 μL、50 ng 的模板 1 μL。引物序列由加拿大哥伦比亚大学提供,在上海生工生物技术有限公司合成。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 45 s,72℃ 延伸 2 min,40 个循环;最后 72℃ 充分

收稿日期:2016-10-10

基金项目:辽宁省科学事业公益研究基金(编号:2015002009)。

作者简介:郑舒文(1990—),女,辽宁本溪人,硕士,研究实习员。

E-mail: eliane150@163.com。

通信作者:王 昊,硕士,助理研究员,研究方向为耐盐碱植物筛选与栽培。E-mail:13134101956@163.com。

[13] Wang G S, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (S1): D933 - D937.

[14] Bergman P, Walter - Jallow L, Broliden K A, et al. The antimicrobial peptide LL - 37 inhibits HIV - 1 replication [J]. *Current HIV Research*, 2007, 5 (4): 410 - 415.

[15] Gordon Y J, Huang L C, Romanowski E G, et al. Human cathelicidin (LL - 37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity [J].

Current Eye Research, 2005, 30 (5): 385 - 394.

[16] Howell M D, Jones J F, Kisich K O, et al. Selective killing of vaccinia virus by LL - 37: implications for eczema vaccinatum [J]. *Journal of Immunology*, 2004, 172 (3): 1763 - 1767.

[17] Howell M D, Gallo R L, Boguniewicz M, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus [J]. *Immunity*, 2006 (24): 341 - 348.

[18] Klotman M E, Chang T L. Defensins in innate antiviral immunity [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2006 (6): 447 - 456.

延伸 7 min, 4 ℃ 保存。配制 1.2% 的琼脂糖凝胶, 在 0.5 × TBE 的缓冲液中电泳 45 min 左右, 取出凝胶, 在 UVP 凝胶成像系统中拍照保存。

1.2.3 数据处理 记录电泳图谱中明亮清晰谱带, 建立“0-1”二元数据矩阵, 在同一位置上, 有谱带的记作“1”, 没有谱带的记作“0”。利用 POPGEN32 软件, 得出观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性(H_e)和 Shannon 多态性信息指数(I)。通过 NTsys2.10e 软件, 计算各供试材料间的相似性系数, 采用 UPGMA 方法进行聚类分析, 获得聚类分析树状图。

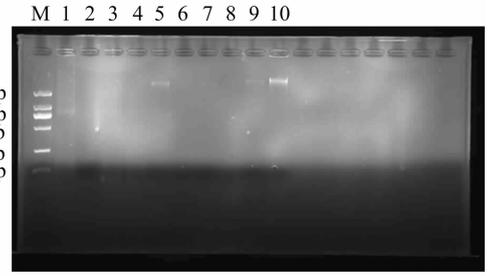
2 结果与分析

2.1 4 种植物 DNA 的检测

基因组 DNA 质量的好坏是后续试验的保证。本试验直接用种子和改良的 CTAB 法提取 4 种植物的基因组 DNA, 如图 1 可直接观察到所提取的 DNA 条带清晰明亮, 并基本在同一水平位置上。说明基因组 DNA 完整性好, 没有降解现象。DNA 模板的质量已经满足试验要求, 可用于下一步的 ISSR-PCR 反应。

2.2 引物筛选和 ISSR 扩增分析

利用优化的反应体系从 100 个 ISSR 引物中筛选出 11 个



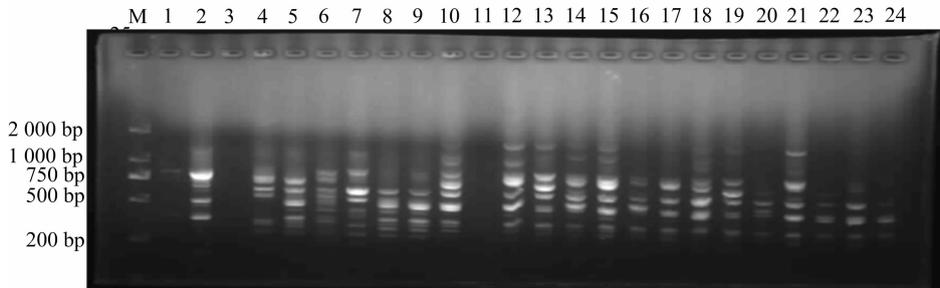
1~3—沙冬青; 4~6—克旗山杏; 7, 8—凉城山杏; 9, 10—沙地云杉

图1 4种植物的 DNA 条带

稳定性好的引物进行分析, 如表 1 所示, 11 个引物对沙冬青、沙地云杉、克旗山杏、凉城山杏这 4 种植物共扩增出 187 条谱带, 其中多态性 DNA 谱带 184, 多态性条带比例的平均值是 98.40%。扩增条带大多在 500 ~ 2 000 bp 之间。每个引物扩增出 7 ~ 12 条不等的条带, 扩增条带数的平均值为 9.5 条, 多态性条带的均值为 9, 多态性百分率高达 99.9%。从图 1 和图 2 都可以看出, 同一个引物下, 4 种植物扩增出的谱带不同, 但是可以从谱带的位置清晰地看出 4 种植物遗传多样性的差异很显著。

表 1 11 条 ISSR 引物序列及其 PCR 扩增

引物	多态性条带数 (条)	扩增条带数 (条)	多态性百分率 (%)
UBC809; AGAGAGAGAGAGAGAGG	16	16	100
UBC810; GAGAGAGAGAGAGAT	17	18	94.4
UBC812; GAG AGA GAG AGA GAG AA	20	21	95.2
UBC813; CTC TCT CTC TCT CTC TT	17	17	100
UBC834; AGAGAGAGAGAGAGAGYT	15	15	100
UBC835; AGA GAG AGA GAG AGA GYC	19	19	100
UBC840; GAG AGA GAG AGA GAG AYT	15	17	88.2
UBC842; GAG AGA GAG AGA GAG AYG	20	20	100
UBC855; ACA CAC ACA CAC ACA CYT	18	18	100
UBC856; ACA CAC ACA CAC ACA CYA	14	14	100
UBC857; ACA CAC ACA CAC ACA CYG	12	12	100
总和	184	187	98.40



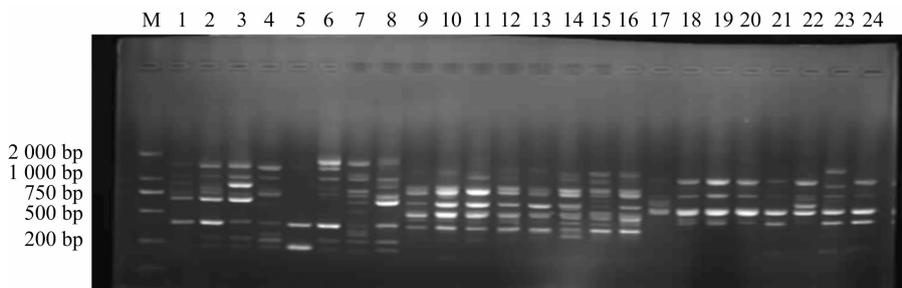
1—沙冬青; 2—克旗山杏; 3—凉城山杏; 4—沙地云杉。以下同上循环。每 4 种样的引物按照相同顺序, 分别是 UBC809、UBC810、UBC812、UBC813、UBC834、UBC835

图2 4种植物的 PCR 扩增条带

2.3 4 种植物的遗传多样性分析

观测等位基因(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性(H_e)与 Shannon's 信息指数(I)是度量遗传多样性水平的常用指标, 运用 POPGENE32 对 4 个种进行分析。4 种植物

在 DNA 水平上的 PPL 达到 98.40% (表 1), 由于它们是不同的物种, 所以多态性条带较多是正常现象。4 种植物的观测等位基因数为 1.984 0, 有效等位基因数为 1.678 1。其中有效等位基因数的数值越接近所检测到的观测等位基因数的绝对



1—沙冬青; 2—克旗山杏; 3—凉城山杏; 4—沙地云杉。以下同上循环。每4种植物的引物按照相同顺序, 引物分别是 UBC836、UBC840、UBC842、UBC855、UBC856、UBC857

图3 4种植物的 PCR 扩增条带

数,表明等位基因在群体中分布越均匀,因为有效等位基因数是反映群体遗传变异大小的一个指标^[14]。分析结果表明,它们相差 0.305 9,差值相对较小,等位基因在群体中分布均匀,表明 4 种植物除了 2 个山杏物种遗传多样性相近以外,4 种植物可能因为生长的环境相似,遗传多样性也有相对于其他植物没有的共通点。另外,4 种植物的基因多样性指标 H_e (0.396 4) 和 I (0.582 0) 的值相对较小,遗传多样性相对较近,进一步说明它们之间的相似性。

2.4 遗传距离和相似性的聚类分析

通过 PopGen32 计算 Nei's 遗传距离,分析 4 种植物的遗传关系,4 种植物的遗传距离分布在 0.401 1~0.913 6 之间(表 2)。其中沙冬青与凉城山杏遗传距离为 0.913 6,距离最大;克旗山杏和凉城山杏的遗传距离是 0.486 2,距离最小。遗传距离是评价种间遗传变异水平的重要指标,遗传距离越小,亲缘关系越近;遗传距离越大,亲缘关系越远。由于克旗山杏和凉城山杏这 2 个植物是相同属种,亲缘性相关遗传距离相对较近。但是克旗山杏和沙地云杉的遗传距离为 0.653 8,相对其他 2 个植物的遗传距离而言较小,说明它们之间存在一定的相似性。利用 UPGMA 法构建的聚类图见图 4。由图 4 可知,在 0.64 的区分度下,克旗山杏和凉城山杏聚为一类,沙冬青和沙地云杉各自一类。在 0.45 的区分度下,沙地云杉和山杏聚为一类。在 0.43 的区分度下,沙冬青跟山杏和沙地云杉聚成一类。表明沙地云杉与山杏有一定的相似性,4 种植物的遗传一致度、遗传距离和聚类分析结果一致。

表 2 物种种间遗传一致度和遗传距离

植物代号	1	2	3	4
1	****	0.433 2	0.401 1	0.449 2
2	0.836 7	****	0.615 0	0.470 6
3	0.913 6	0.486 2	****	0.459 9
4	0.800 3	0.653 8	0.776 8	****

注:上三角为遗传一致度,下三角为遗传距离;1~4 分别是沙冬青、克旗山杏、凉城山杏、沙地云杉。

3 结论与讨论

采用分子标记探讨植物的相似性已有较多的报道^[6-8]。目前,分子标记已广泛应用于植物物种鉴定、指纹图谱、遗传多样性、基因定位及分子生态学研究。本研究从 100 个 ISSR 引物中筛选出 11 个扩增条带清晰且多态性高的引物,采用这

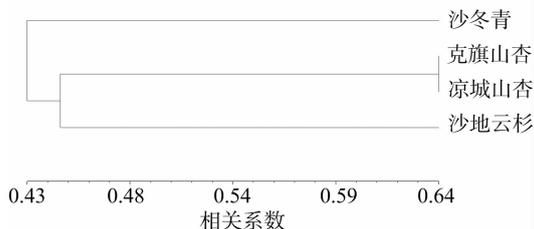


图4 4种植物的聚类分析

11 个引物对沙地云杉、沙冬青、克旗山杏和凉城山杏进行遗传多样性研究。应用 POPGENE32 分析和 UPGMA 法聚类分析,结果表明:沙地云杉、沙冬青、克旗山杏和凉城山杏可分为 3 类,首先克旗山杏和凉城山杏为 I 类,沙地云杉为 II 类,沙冬青为 III 类。通过聚类分析结果显示,除了山杏物种之间的亲缘性之外,沙冬青与它们的遗传距离大,相似性较低;沙地云杉与山杏 2 个不同物种却有一定的相似性,遗传距离小。

参考文献:

- [1]李慧卿,马文元,李慧勇. 沙冬青抗逆性研究进展[J]. 世界林业研究,2000,13(5):67-71.
- [2]陶玲,李新荣,刘新民,等. 中国珍稀濒危荒漠植物保护等级的定量研究[J]. 林业科学,2001,37(1):52-57.
- [3]田晓明,陈世忠,屠鹏飞,等. 沙冬青地上部分的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(19):2204-2206.
- [4]李银科,刘世增,康才周,等. 温度对樟子松和沙地云杉种子萌发特征的影响[J]. 水土保持通报,2011,31(4):73-74.
- [5]袁雷,李春娥,储少林,等. 冷季深入对 AMSR-E 监测内蒙古积雪的影响[J]. 草业科学,2008,25(7):55-58.
- [6]Debnath S C. Inter-simple sequence repeat (ISSR)-PCR analysis to assess genetic diversity in a collection of wild cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) clones[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology,2007,82(5):727-732.
- [7]Sundaramoorthi J, Babu C, Ram S G. Molecular diversity in the primary and secondary gene pools of genus *Oryza* [J]. Plant Systematics and Evolution,2009,279(1/2/3/4):115-123.
- [8]Bhagyawant S S, Srivastava N. Genetic fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm using ISSR markers and their relationships[J]. African Journal of Biotechnology,2008,7(24):4428-4431.